

BREVET D'INVENTION

CERTIFICAT D'UTILITÉ - CERTIFICAT D'ADDITION

REC'D 19 DEC 2003

WIPO PCT

COPIE OFFICIELLE

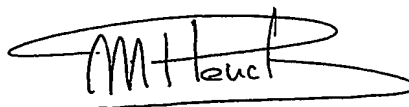
Le Directeur général de l'Institut national de la propriété industrielle certifie que le document ci-annexé est la copie certifiée conforme d'une demande de titre de propriété industrielle déposée à l'Institut.

Fait à Paris, le 09 DEC. 2003

Pour le Directeur général de l'Institut
national de la propriété industrielle
Le Chef du Département des brevets

DOCUMENT DE PRIORITÉ

PRÉSENTÉ OU TRANSMIS
CONFORMÉMENT À LA
RÈGLE 17.1.a) OU b)



Martine PLANCHE

BEST AVAILABLE COPY

CERTIFIED COPY OF
PRIORITY DOCUMENT

INSTITUT
NATIONAL DE
LA PROPRIÉTÉ
INDUSTRIELLE

SIEGE
26 bis, rue de Saint Petersburg
75800 PARIS cedex 08
Téléphone : 33 (0)1 53 04 53 04
Télécopie : 33 (0)1 53 04 45 23
www.inpi.fr

REQUÊTE EN DÉLIVRANCE
page 1/2



Cet imprimé est à remplir lisiblement à l'encre noire

DB 540 @ W / 010801

REMISE DES PIÈCES DATE 17 SEPT 2002 LIEU 69 INPI LYON N° D'ENREGISTREMENT 0211485 NATIONAL ATTRIBUÉ PAR L'INPI DATE DE DÉPÔT ATTRIBUÉE 17 SEP. 2002 PAR L'INPI		1. NOM ET ADRESSE DU DEMANDEUR OU DU MANDATAIRE À QUI LA CORRESPONDANCE DOIT ÊTRE ADRESSÉE bioMérieux Service Propriété Industrielle A l'attention de Frédérique DENJEAN Chemin de l'Orme 69280 MARCY L'ETOILE	
Vos références pour ce dossier (facultatif) POLYTOP			
Confirmation d'un dépôt par télécopie <input type="checkbox"/> N° attribué par l'INPI à la télécopie			
2. NATURE DE LA DEMANDE Demande de brevet <input checked="" type="checkbox"/> Demande de certificat d'utilité <input type="checkbox"/> Demande divisionnaire <input type="checkbox"/> Demande de brevet initiale N° _____ Date _____ ou demande de certificat d'utilité initiale N° _____ Date _____ Transformation d'une demande de brevet européen Demande de brevet initiale <input type="checkbox"/> N° _____ Date _____		Cochez l'une des 4 cases suivantes	
3. TITRE DE L'INVENTION (200 caractères ou espaces maximum) Protéine recombinante chimérique et diagnostic in vitro			
4. DÉCLARATION DE PRIORITÉ OU REQUÊTE DU BÉNÉFICE DE LA DATE DE DÉPÔT D'UNE DEMANDE ANTÉRIEURE FRANÇAISE		Pays ou organisation _____ N° _____ Date _____ Pays ou organisation _____ N° _____ Date _____ Pays ou organisation _____ N° _____ Date _____ <input type="checkbox"/> S'il y a d'autres priorités, cochez la case et utilisez l'imprimé «Suite»	
5. DEMANDEUR (Cochez l'une des 2 cases) <input checked="" type="checkbox"/> Personne morale <input type="checkbox"/> Personne physique			
Nom ou dénomination sociale Prénoms Forme juridique N° SIREN Code APE-NAF Domicile ou siège Nationalité N° de téléphone (facultatif) Adresse électronique (facultatif)		bioMérieux S.A. 16 7 3 6 2 0 3 9 9 Chemin de l'Orme 16 9 2 8 0 MARCY L'ETOILE FRANCE Française 04 78 87 53 28 N° de télécopie (facultatif) 04 78 87 21 16 <input type="checkbox"/> S'il y a plus d'un demandeur, cochez la case et utilisez l'imprimé «Suite»	

Remplir impérativement la 2^{ème} page

REMISE DES PIÈCES DATE 17 SEPT 2002 69 INPI LYON LIEU 02-11-485		N° D'ENREGISTREMENT NATIONAL ATTRIBUÉ PAR L'INPI		DB 540 @ W / 010801
Vos références pour ce dossier : <i>(facultatif)</i>		POLYTOP		
6 MANDATAIRE <i>(s'il y a lieu)</i>		DENJEAN Frédérique bioMérieux		
Nom Prénom Cabinet ou Société		DENJEAN Frédérique bioMérieux		
N° de pouvoir permanent et/ou de lien contractuel		PG n°10870		
Adresse	Rue	Chemin de l'Orme		
	Code postal et ville	16 9 12 18 10 MARCY L'ETOILE		
	Pays			
N° de téléphone <i>(facultatif)</i>		04 78 87 75 70		
N° de télécopie <i>(facultatif)</i>		04 78 87 21 16		
Adresse électronique <i>(facultatif)</i>		frederique.denjean@eu.biomerieux.com		
7 INVENTEUR (S)		Les inventeurs sont nécessairement des personnes physiques		
Les demandeurs et les inventeurs sont les mêmes personnes		<input type="checkbox"/> Oui <input checked="" type="checkbox"/> Non : Dans ce cas remplir le formulaire de Désignation d'inventeur(s)		
8 RAPPORT DE RECHERCHE		Uniquement pour une demande de brevet (y compris division et transformation)		
Établissement immédiat ou établissement différé		<input checked="" type="checkbox"/> Établissement immédiat <input type="checkbox"/> Établissement différé		
Paiement échelonné de la redevance <i>(en deux versements)</i>		Uniquement pour les personnes physiques effectuant elles-mêmes leur propre dépôt <input type="checkbox"/> Oui <input type="checkbox"/> Non		
9 RÉDUCTION DU TAUX DES REDEVANCES		Uniquement pour les personnes physiques <input type="checkbox"/> Requête pour la première fois pour cette invention <i>(joindre un avis de non-imposition)</i> <input type="checkbox"/> Obtenue antérieurement à ce dépôt pour cette invention <i>(joindre une copie de la décision d'admission à l'assistance gratuite ou indiquer sa référence)</i> : AG		
Si vous avez utilisé l'imprimé «Suite», indiquez le nombre de pages jointes				
10 SIGNATURE DU DEMANDEUR OU DU MANDATAIRE (Nom et qualité du signataire)		VISA DE LA PRÉFECTURE OU DE L'INPI M. Ducet		

DESCRIPTION

La présente invention est relative à une protéine recombinante chimérique, un ADN codant ladite protéine recombinante chimérique, ainsi que l'utilisation de cette protéine recombinante chimérique pour le diagnostic in vitro des maladies en relation avec un virus.

Le diagnostic précoce de la présence d'un virus dans l'organisme est essentiel afin, d'une part, d'éviter la propagation du virus par les malades qui ne connaissent pas encore leur séropositivité, et d'autre part, de proposer à ces patients un traitement adapté pour reculer la date d'apparition des symptômes.

Dans le cas du SIDA (syndrome d'immunodéficience acquise), conséquence de l'infection par les rétrovirus HIV-1 (human immunodeficiency virus-1) ou HIV-2 (human immunodeficiency virus-2), la primo infection est suivie d'une période asymptomatique, d'une durée variable avant que la maladie n'évolue chez la plupart des patients en SIDA, caractérisé par l'apparition d'infections à germes opportunistes, de tumeurs et de manifestations neurologiques, et le diagnostic précoce de la présence du virus HIV dans l'organisme doit être effectué que le patient ait initialement été infecté par HIV-1 ou par HIV-2.

La plupart des tests de diagnostic commercialisés est basé sur une réaction antigène-anticorps dirigée contre certaines protéines virales, telles que les protéines transmembranaires de l'enveloppe virale. Dans le cas d'HIV-1, les protéines de l'enveloppe sont dérivées du gène env, qui code une glycoprotéine précurseur d'un poids moléculaire de 160 000 daltons, dénommée gp 160. La gp 160 est ensuite clivée en deux protéines virales de l'enveloppe, la gp 120 et la gp 41. Dans le cas d'HIV-2, la glycoprotéine précurseur est la gp140, clivée en gp36 et gp105/110. Ainsi, dans l'article scientifique de Vallari *et al* (Journal of microbiology, pages 3657-3661, 1998), on retrouve la description d'un kit de diagnostic permettant de détecter la présence de virus HIV-1 groupe M, HIV-1 groupe O et HIV-2, par l'utilisation de trois protéines recombinantes, dérivées des régions env de virus HIV-1 groupe M, HIV-1 groupe O et HIV-2. D'une façon comparable, dans l'article scientifique de Shin *et al* (Biochemistry

and molecular biology international, volume 43, n°4, pages 713-721, 1997), sont décrits des peptides multi-antigéniques pour détecter des infections aux virus HIV-1 ou HIV-2.

Toutefois, dans de tels tests de diagnostic de plusieurs souches virales, il est nécessaire lors de l'analyse de séra par la technique ELISA (Enzyme Linked

ImmunoSorbent Assay), de fixer sur le support plusieurs protéines recombinantes ayant des caractéristiques d'adsorption (ou coating) individuelles différentes, induisant des problèmes notamment lors de l'étape de révélation. De plus, la multiplicité des protéines recombinantes engendre des coûts de fabrication importants.

Afin d'éviter ces problèmes de différences de coating entre les différentes protéines recombinantes, d'autres tests de diagnostic utilisent préférentiellement des protéines recombinantes chimériques, porteuse de plusieurs épitopes dirigés contre des protéines virales différentes.

Ainsi, le brevet EP-B-0 577 894 décrit la construction d'une protéine recombinante chimérique utilisée pour le diagnostic du SIDA. Cette protéine est porteuse des épitopes dirigés contre les protéines virales dérivées du gène gag de HIV-2 et contre la protéine gp120 d'HIV-1. Toutefois, cette protéine recombinante ne permet pas la détection simultanée des patients infectés par les virus HIV-1 de groupe M et O, ce qui peut induire des risques de faux négatifs (patient détecté séronégatif alors qu'il est porteur du virus), faux négatifs dont les conséquences peuvent être dramatiques. De plus, cette protéine recombinante n'est pas porteuse de l'épitope dirigé contre la gp41, qui est pourtant l'épitope immunodominant majeur, ce qui augmente, là encore, le risque d'apparition de faux négatif. De même, dans l'article scientifique de Han *et al* (Biochemistry and molecular biology international, vol 46 n°3, 1998), il est décrit une protéine recombinante présentant un épitope dirigé contre la gp41 d'HIV-1, et un épitope dirigé contre la gp36 d'HIV-2, ces deux épitopes étant liés par un peptide de liaison afin de permettre l'accessibilité à chacun des épitopes. Toutefois, cette protéine recombinante ne permet pas la détection simultanée des patients infectés par les virus HIV-1 de groupe M et O, ce qui peut induire, là encore, des risques de faux négatifs.

La présente invention se propose de résoudre l'ensemble des inconvénients de l'état de la technique, en proposant une protéine recombinante chimérique, facile à

purifier et à synthétiser, présentant une forte immunoréactivité vis-à-vis de séra de patients susceptibles d'être infectés par un ou plusieurs virus.

Les définitions suivantes permettront de mieux comprendre l'invention.

5 Par ADN recombinant, on entend une séquence nucléotidique construite artificiellement et obtenue par génie génétique. A titre indicatif, ledit ADN recombinant peut être inséré dans un organisme hôte d'expression, tel que notamment une bactérie, par un vecteur d'expression, notamment un plasmide bactérien ou un bactériophage.

10 Par fragment nucléotidique, on entend une succession d'au moins trois acides nucléotidiques codant au moins un acide aminé.

Par site de coupure, on entend un site permettant la séparation de deux fragments nucléotidiques par l'action d'au moins un moyen de coupure, tel que notamment une enzyme de restriction qui est capable, au niveau de site de coupure correspondant à une séquence nucléotidique spécifique de générer pour chaque brin deux extrémités, l'une
15 ayant un groupement 3'-OH, l'autre un groupement 5'-P.

Par protéine recombinante chimérique, on entend une protéine construite artificiellement et obtenue par génie génétique. A titre indicatif, ladite protéine recombinante chimérique peut être produite par un organisme hôte d'expression modifiée génétiquement par insertion de la séquence nucléotidique codant ladite
20 protéine recombinante chimérique par un vecteur d'expression.

Par région épitopique, on entend une région peptidique qui va interagir de façon stéréospécifique avec la région peptidique paratopique de l'anticorps dirigé contre le microorganisme, tel que notamment le virus, présent dans le sérum du patient. Les régions épitopiques les plus immunogéniques sont dites immunodominantes.

25 Par région de liaison, on entend une région assurant une meilleure accessibilité des régions paratopiques des différents anticorps présents dans le sérum des patients vis à vis des régions épitopiques d'intérêt correspondantes de la protéine recombinante chimérique.

Par région de fixation, on entend une région permettant de fixer ladite protéine recombinante chimérique vis-à-vis :
30

- d'un support, de manière direct et/ou indirect, et/ou

- d'une molécule de détection,

Le support peut être composé de matériaux, tels que :

- le verre, un matériau peu onéreux, inerte et mécaniquement stable ,
- les polymères : plaques de microtitration...

- 5
- les métaux : colonne de métal chelate de chromatographie d'affinité,
 - les particules magnétiques, telles que décrites dans les demandes de brevet WO-A-97/34909, WO-A-97/45202, WO-A-98/47000 et WO-A-99/35500 déposées par la demanderesse.

10 Le support peut alors être utilisé comme support d'analyse, notamment lors d'un ELISA (Enzym Linked ImmunoSorbent Assay), pour des étapes de purification lors d'une chromatographie d'affinité, pour des étapes de lavage lorsque ladite protéine recombinante chimérique, fixée sur une particule magnétique est retenue par aimantation dans un lieu prédéterminé.

15 Par molécule de détection, on entend une molécule associée à un marqueur permettant de générer directement ou indirectement un signal détectable. Ces marqueurs peuvent être notamment radioactifs, enzymatiques, fluorescents.

La fixation de la protéine recombinante chimérique sur ledit support ou ladite molécule de détection peut impliquer des ligands capables de réagir avec un anti-ligand. On peut citer à titre d'exemples les couples ligand/anti-ligand suivants :

- 20
- biotine/streptavidine,
 - haptène/anticorps,
 - antigène/anticorps,
 - peptide/anticorps,
 - sucre/lectine,

25

Ainsi, l'invention concerne un ADN recombinant codant une protéine recombinante chimérique comprenant :

- 30
- au moins deux premiers fragments nucléotidiques codant chacun une région épitopique d'au moins un microorganisme,
 - au moins un deuxième fragment nucléotidique codant une région de liaison, et

- au moins un troisième fragment nucléotidique codant une région de fixation.

Selon un mode préférée de l'invention, le deuxième fragment nucléotidique comprend au moins un site de coupure.

Selon un mode préféré, l'ADN recombinant tel que décrit précédemment est caractérisé en ce que chaque fragment nucléotidique comprend au moins un troisième fragment nucléotidique codant une région de fixation.

L'invention concerne également un ADN recombinant codant une protéine recombinante chimérique comprenant :

- au moins deux premiers fragments nucléotidiques codant chacun une région épitopique d'au moins un microorganisme,
- au moins un deuxième fragment nucléotidique codant chacun une région de liaison, ledit deuxième fragment nucléotidique comprenant en outre au moins un site de coupure.

Selon un mode préféré de l'invention, ledit deuxième fragment nucléotidique a pour séquence au moins l'une quelconque des séquences suivantes, prises seules ou en combinaison : SEQ ID N°11, SEQ ID N°13, SEQ ID N°15, SEQ ID N°17, SEQ ID N°19, ou SEQ ID N°20.

Selon un mode préféré de l'invention, ledit microorganisme est un virus, préférentiellement le virus HIV-1 ou le virus HIV-2. Selon un autre mode préféré de l'invention, le virus HIV-1 est de groupe M ou de groupe O.

Selon un mode préféré de l'invention, les premiers fragments nucléotidiques codent au moins deux régions immunodominantes comprises parmi tout ou partie de la glycoprotéine gp 120 d'HIV-1, de la glycoprotéine gp 41 d'HIV-1 de groupe M, de la glycoprotéine gp 41 d'HIV-1 de groupe O ou de la glycoprotéine gp 36 d'HIV-2.

Préférentiellement, les premiers fragments nucléotidiques ont pour séquence l'une quelconque des séquences SEQ ID N°3, SEQ ID N°5, SEQ ID N°7 ou SEQ ID N°9.

Selon un autre mode préféré de l'invention, ledit troisième fragment nucléotidique a pour séquence l'une quelconque des séquences SEQ ID N°21, SEQ ID N° 23, ou SEQ ID N° 25.

L'invention concerne également une protéine recombinante chimérique codée par un ADN recombinant tel que décrit ci-dessus comprenant

- au moins deux régions épitopiques d'au moins un microorganisme,
- au moins une région de liaison, et
- au moins une région de fixation.

~~Selon un mode préféré de l'invention, la région de liaison est un peptide comprenant au~~

5 moins une glycine et/ou au moins une sérine.

Préférentiellement, ladite région de liaison a pour séquence l'une quelconque des séquences SEQ ID N° 12, SEQ ID N°14, SEQ ID N°16 ou SEQ ID N°18.

Selon un autre mode préféré de l'invention, ladite région de fixation est un peptide situé à l'une quelconque des extrémités N ou C terminales de ladite protéine recombinante chimérique.

10

Préférentiellement, ladite région de fixation est une région riche en histidines et ses dérivés, tel qu'une région contenant une densité d'histidines, supérieure ou égale à 25%, et préférentiellement supérieure ou égale à 33%. Encore plus préférentiellement, la région de fixation comporte au moins quatre histidines et préférentiellement six histidines adjacentes.

15

Selon un autre mode préféré de l'invention, ladite région de fixation est un peptide comprenant au moins une lysine.

Préférentiellement, ladite région de fixation a pour séquence SEQ ID N°22, 24 ou 26.

L'invention concerne également un vecteur d'expression comprenant un ADN recombinant tel que décrit ci dessus.

20

L'invention concerne également l'utilisation d'au moins un ADN recombinant et/ou d'au moins une protéine recombinante chimérique tels que décrit ci dessus pour le diagnostic in vitro.

25 Les exemples suivants sont donnés à titre illustratif et n'ont aucun caractère limitatif. Ils permettront de mieux comprendre l'invention.

Exemple 1 : Construction d'une protéine chimérique recombinante permettant la reconnaissance d'anticorps anti HIV-1 groupe O et M et HIV-2.

La séquence nucléotidique SEQ ID N°1 a été conçue pour coder une protéine recombinante selon l'invention, et clonée dans un vecteur d'expression. Elle correspond à la séquence suivante :

SEQ ID N° 1 : ATG AGG GGA TCC AGA ATC CTA GCT GTG GAA AGA TAC
CTA AAG GAT CAA CAG CTC CTA GGG ATT TGG GGT TGC TCT GGA
AAA CTC ATT TGC ACC ACT GCT GTG AGC TCC GGT TCA GGC GCT ATA
GAG AAG TAC CTA CAG GAC CAG GCG CGG CTA AAT TCA TGG GGA
TGT GCG TTT AGA CAA GTC TGC TCG AGC GGT TCT GGA GGA GGA
GAT ATG AGG GAC AAT TGG AGA AGT GAA TTA TAT AAA TAT AAA
GTA GTA AAA ATT GAA CCA TTA GGA GTA GCA CCC ACC AAG TCT
GCA GGC CGT CTG CTT GCT CTG GAA ACC CTG CTT CAG AAC CAA
CAG CTG CTT TCT CTG TGG GGT TGC AAA GGT AAG CTG GTT TGC
TAC ACC TCT GTT AAA GCT TCC *CAC CAT CAC CAT CAC CAT* TGA TCT
AGA

La protéine recombinante chimérique codée par la séquence SEQ ID N°1, comprend 137 acides aminés, pour une masse moléculaire de 15191,5 Da. Sa séquence en acides aminés est la suivante :

SEQ ID N°2 : MRGS **RILAVE**RYLK **DQQL**GIWGC SGKLICTTAV SSGSG
AIEKYLQDQA RLNSWGCAFR QVC SSGS GGGDMRDNWR SELYKYKVVK
IEPLGVAPTK SAG RLLALETLLQ NQQLLSLWG CKGKLVCYTS V KAS
HHHHHH.

La présence de MRGS et la séquence ATG AGG GGA TCC correspondante est introduite par la technique de clonage utilisée dans le vecteur d'expression pMR. La séquence d'intérêt est introduite dans le vecteur pMR entre le site de restriction BamHI en 5' et le site XbaI en 3', ce qui conduit à la fusion de la séquence MRGS en N-terminal de la protéine d'intérêt. Seul le codon d'initiation ATG et par conséquent l'acide aminé Met est vraiment indispensable dans cette séquence.

Les régions épitopiques sont indiquées en gras, la région de fixation en italique et les régions de liaisons en non gras non italique.

Cette protéine recombinante chimérique comprend :

a) plusieurs **régions épitopiques** (indiquées en gras dans la SEQ ID n°2) permettant :

~~• la reconnaissance des anticorps anti-HIV-1 (groupe M ; gp41), :~~

- 5 La séquence SEQ ID N°3 est issue de la souche virale HIV-1 groupe M (clone de référence HXB2) et correspond à la séquence suivante :

SEQ ID N°3 : AGA ATC CTA GCT GTG GAA AGA TAC CTA AAG GAT CAA
CAG CTC CTA GGG ATT TGG GGT TGC TCT GGA AAA CTC ATT TGC ACC
ACT GCT GTG,

- 10 Cette séquence est amplifiée par PCR (polymerase chain reaction) par l'utilisation d'amorces d'amplification spécifiques (amorce sense 5' AGT CGG ATC CAG AAT CCT AGC TGT GGA A 3' et amorce antisense 5' GCC TGA TCC GGA GCT CAC AGC AGT GGT GCA AAT 3' ; 17 cycles de PCR sont réalisés avec à chaque cycle une étape de dénaturation à 94°C pendant 1 minute (min), une étape d'hybridation à
15 52°C pendant 1 min et une étape d'élongation 72°C pendant 20 secondes.

Le fragment nucléotidique obtenu code pour le peptide correspondant à la séquence en acides aminés SEQ ID N°4 : RILAVERYLK DQQLLGIWGC SGKLICTTAV.

• la reconnaissance des anticorps anti-HIV-1 (groupe O ; gp41) :

- 20 La séquence SEQ ID N° 5 correspond à une séquence ADN artificielle, conçue à partir de la séquence en acide aminé de la souche virale HIV-1 groupe O [clone ANT70]. Cette portion synthétique a été conçue en sélectionnant des codons dont l'utilisation est favorable à l'expression de gène chez *E. coli*. La séquence est la suivante :

25 SEQ ID N° 5 : CGT CTG CTT GCT CTG GAA ACC CTG CTT CAG AAC CAA
CAG CTG CTT TCT CTG TGG GGT TGC AAA GGT AAG CTG GTT TGC TAC
ACC TCT GTT.

- 30 Cette séquence est construite par PCR par l'utilisation de 3 oligonucléotides (un oligonucléotide sens 5' AAG TCT GCA GGC CGT CTG CTT GCT CTG GAA ACC CTG CTT CAG AAC CAA CAG CTG CTT TCT 3' et deux oligonucléotides antisens 5' GCT ATC TAG ATC AAT GGT GAT GGT GAT GGT GGG AAG CTT TAA CAG AGG TGT
AGC AAA C 3'

et 5' AAC AGA GGT GTA GCA AAC CAG CTT ACC TTT GCA ACC CCA CAG
AGA AAG CAG CTG TTG GTT 3' ; 17 cycles de PCR sont réalisés avec à chaque

cycle une étape de dénaturation à 9°C pendant 1 min, une étape d'hybridation à 50°C pendant 1 min et une étape d'élongation 68°C pendant 20 secondes).

Ce fragment nucléotidique code pour le peptide correspondant à la séquence en acides aminés SEQ ID N°6 : RLLALETLLQ NQQLLSLWGC KGKLVCYTSTV .

5 • la reconnaissance des anticorps anti-HIV-2 (gp36) :

La séquence SEQ ID N°7 est issue de la souche virale HIV-2 (clone de référence ROD) et correspond à la séquence suivante :

SEQ ID N°7 : GCT ATA GAG AAG TAC CTA CAG GAC CAG GCG CGG CTA
AAT TCA TGG GGA TGT GCG TTT AGA CAA GTC TGC

10 Cette séquence est amplifiée par PCR par l'utilisation d'amorces d'amplification spécifiques (amorce sense 5' CTG TGA GCT CCG GTT CAG GCG CTA TAG AGA AGT ACC TA 3' et amorce antisense 5' AGA ACC GCT CGA GCA GAC TTG TCT AAA CGC 3' ; 17 cycles de PCR sont réalisés avec à chaque cycle une étape de dénaturation à 94°C pendant 1 min, une étape d'hybridation à 52°C pendant 1 min et
15 une étape d'élongation 72°C pendant 20 secondes).

Ce fragment nucléotidique code pour le peptide correspondant à la séquence en acides aminés SEQ ID N°8 : AIEKYLQDQA RLNSWGCAFR QVC.

 • la reconnaissance des anticorps anti-HIV-1 (groupe M ; gp120) :

20 La séquence SEQ ID N°9 est issue de la souche virale HIV-1 groupe M (clone de référence HXB2) et correspond à la séquence suivante :

SEQ ID N°9 : GGA GGA GGA GAT ATG AGG GAC AAT TGG AGA AGT GAA
TTA TAT AAA TAT AAA GTA GTA AAA ATT GAA CCA TTA GGA GTA GCA
CCC ACC AAG.

25 Cette séquence est amplifié par PCR par l'utilisation d'amorces d'amplification spécifiques (amorce sense 5' GTC TGC TCG AGC GGT TCT GGA GGA GGA GAT ATG AGG 3' et amorce antisens 5' ACG TCC TGC AGA CTT GGT GGG TGC TAC TCC 3' ; 17 cycles de PCR sont réalisés comprenant à chaque cycle une étape de dénaturation à 94°C pendant 1min, une étape d'hybridation à 52°C pendant 1 min et
une étape d'élongation à 72°C pendant 20 secondes).

30 Ce fragment nucléotidique code pour le peptide correspondant à la séquence en acides aminés SEQ ID N°10 : GGGDMRDNRW SELYKYKVVK IEPLGVAPTK

b) des régions de liaisons, entre chacune des régions épitopiques citées précédemment, permettant :

- 5 ~~• au niveau nucléotidique l'introduction de six sites de coupure par des~~
enzymes de restriction pouvant être utilisés pour modifier, retirer ou ajouter
un domaine épitopique, et
- au niveau protéique, l'obtention de régions d'espacement, flexibles, assurant
une meilleure accessibilité des anticorps potentiels à chacun des domaines.

10 Ainsi, la séquence nucléotidique SEQ ID N°11 : *G* AGC TCC GGT TCA GGC permet
l'obtention d'un site de coupure par l'enzyme Sac I (indiqué en gras), le *G* indiqué en
italique, étant la dernière base de la séquence nucléotidique codant le peptide
permettant la reconnaissance des anticorps anti HIV-1, groupe M. Cette séquence code
la région flexible correspondant au peptide de séquence SEQ ID N°12 : SSG SG.

15 La séquence nucléotidique SEQ ID N°13 : *C* TCG AGC GGT TCT permet l'obtention
d'un site de coupure par l'enzyme Xho I (indiqué en gras), le *C* indiqué en italique,
étant la dernière base de la séquence nucléotidique codant le peptide permettant la
reconnaissance des anticorps anti HIV-2. Cette séquence code la région flexible
correspondant au peptide de séquence SEQ ID N°14 : SSGS.

20 La séquence nucléotidique SEQ ID N°15 : TCT GCA GGC permet l'obtention d'un
site de coupure par l'enzyme Pst I (indiqué en gras). Cette séquence code la région
flexible correspondant au peptide de séquence SEQ ID N° 16 : SAG

La séquence nucléotidique SEQ ID N°17 : AAA GCT TCC permet l'obtention d'un
site de coupure par l'enzyme Hind III (indiqué en gras). Cette séquence code la région
flexible correspondant au peptide de séquence SEQ ID N° 18 : KAS.

25 Les séquences SEQ ID N°19 : ATG AGG GGA TCC et SEQ ID N°20 TGA TCT
AGA permettent respectivement d'obtenir un site de coupure par l'enzyme BamH1
(indiqué en gras) et un site de coupure par l'enzyme XbaI permettant l'insertion ou
l'extraction de la totalité de la séquence codant la protéine recombinante selon
l'invention dans un plasmide.

c) **une région de fixation et permettant la purification de la protéine recombinante chimérique** : une séquence hexahistidine est ajoutée en C-terminal afin de faciliter ultérieurement l'étape de purification de la protéine recombinante chimérique. Ce peptide, codée par la séquence nucléotidique SEQ ID N°21 : CAC CAT CAC CAT CAC CAT, correspond à la séquence SEQ ID N°22 : HHHHHH.

A titre indicatif, cette région de fixation particulière, comprenant une succession d'histidine, permet notamment la fixation orientée de la protéine recombinante sur un support constitué de silice ou d'oxydes métalliques, tel que décrit dans le brevet FR-B-98/04879.

L'ordre des séquences codant les différentes régions épitopiques immunodominantes de la protéine recombinante chimérique peut être éventuellement modifié. La longueur des régions de liaison peut également être modifiée pour améliorer l'accessibilité d'un épitope. Certains épitopes peuvent être présentés plusieurs fois au sein de la protéine recombinante chimérique. Les épitopes peuvent également présenter des variations par rapport aux séquences décrites dans l'exemple ci dessus selon le sous type ou le clone HIV qu'ils représentent.

Exemple 2 : Expression et purification de la protéine recombinante chimérique de l'exemple 1

La première étape consiste à insérer la séquence SEQ ID N°1 (exemple 1), dans un vecteur d'expression (pMR) puis à transformer une bactérie *E. coli* (souche BL21) avec la construction plasmidique obtenue selon un protocole classique de clonage connu de l'homme du métier. Les bactéries transformées sont sélectionnées grâce à leur résistance à l'ampicilline portée par le vecteur pMR.

Un clone de bactérie recombinante est alors sélectionné pour ensemercer une préculture de 40 ml de milieu 2x YT (tryptone 16 g/l ; yeast extract 10 g/l ; NaCl 5 g/l, pH 7,0) contenant 100 µg/ml ampicilline. Après 15 à 18h d'incubation à 37°C sous agitation à 250 rpm, cette préculture est utilisée pour ensemercer 1 litre de milieu 2xYT contenant 2 % glucose et 100 µg/ml ampicilline. Cette culture est incubée à 37°C sous agitation à 250 rpm. Lorsque la $DO_{600\text{ nm}}$ a atteint 0,7-0,9, de l'IPTG (isopropyl-β-D-thiogalactoside, Eurogentec) est ajouté à 0,5 mM final dans le milieu de culture et la

culture est poursuivie pendant 4 h. L'IPTG permet d'induire l'expression de la protéine chimérique recombinante SEQ ID N°2 qui s'accumule dans les bactéries sous forme de corps d'inclusion. Après 4 h d'induction, la culture est centrifugée à 6000 rpm pendant 30 min à 4°C et le culot de bactéries est congelé à -80°C.

- 5 Afin d'extraire la protéine recombinante des corps d'inclusion, les bactéries décongelées sont lysées. Pour cela, les culots de bactéries correspondant à une culture d'un litre sont repris dans 100 ml de tampon de lyse (PBS 1X contenant des inhibiteurs de protéases : lysozyme : 1 mg/ml ; benzonase : 2,5 unités par ml (Novagen®) et Mg^{2+} : 1 mM) en vortexant jusqu'à obtenir une suspension homogène. Cette solution est
10 incubée 1 heure à température ambiante sous agitation. La solution est ensuite centrifugée 30 min à 4°C à 10000 g.
Le culot obtenu contient les corps d'inclusion. Ce culot est mis en suspension dans 50 ml de tampon de solubilisation (bicarbonate de sodium : 40 mM ; NaCl : 300 mM ; SDS : 1% ; β -mercaptoethanol : 20 mM, pH 9,6) contenant des inhibiteurs de protéases
15 (complete EDTA-free, Roche®). La solution ainsi obtenue est incubée 16 à 18 h sous agitation entre 18 et 25°C. Elle est ensuite diluée au quart avec un tampon PBS 2X contenant 8 mM d'imidazole et des inhibiteurs de protéases (complete EDTA-free, Roche®) à pH 8,0. Une centrifugation à 10 000 g pendant 30 min à 20°C permet d'obtenir un surnageant limpide, qui est filtré sur filtre 0,45 μ et purifié par
20 chromatographie d'affinité sur une colonne de chélation de métaux (matrice nickel-nitrilotriacetic acid (Ni-NTA, Qiagen). Les 200 ml d'échantillon sont déposés (1 ml/min) à 18-25°C sur une colonne de 8 ml de gel Ni-NTA équilibrée en tampon A1 (PBS 2X, urée 4 M, imidazole 6 mM, pH 7,8 contenant β -mercaptoethanol 5 mM) ou A2 (PBS 2X, SDS 0.25 %, imidazole 6 mM, pH 7,8 contenant β -mercaptoethanol 5
25 mM). La colonne est ensuite lavée en tampon A1 ou A2, jusqu'à obtention en sortie de colonne d'une $DO_{280nm}=0$. L'élution de la protéine recombinante est obtenue par application d'un tampon B1 (PBS 2X, urée 4M, imidazole 100 mM, pH 7,5, contenant β -mercaptoethanol 5 mM) ou B2 (PBS 2X, SDS 0.25%, imidazole 100 mM, pH 7,5, contenant β -mercaptoethanol 5 mM).
30 Des quantités de l'ordre de 50 mg de protéine recombinante purifiée peuvent être obtenues à partir d'un litre de culture.

La protéine recombinante ainsi purifiée est soumise à un traitement dénaturant par addition de SDS (1500 molécules par molécule de protéine recombinante), DTT 5 mM, bicarbonate de sodium 50 mM au pH 9,6 et chauffage 30 min à 37°C. La stockiométrie molécules de SDS/ molécules de protéine recombinante peut être modifiée (idéalement
5 diminuée si la durée ou température de chauffage est augmentée). Par exemple, des résultats similaires sont obtenus par addition de 250 molécules de SDS/molécule de protéine recombinante, DTT 5 mM, bicarbonate de sodium 50 mM au pH 9.6 et chauffage 2 heures à 40°C.

La protéine ainsi dénaturée est stabilisée par addition de Polyéthylène glycol (MW 3350
10 en particulier) pour une stockiométrie de 10 molécules de PEG par molécule de protéine puis dialysée à 4°C pendant 18 à 24 heures contre un tampon bicarbonate de sodium 50mM, EDTA 1mM, SDS 0,01%, PEG 1 mg/l, pH 9,6.

15 **Exemple 3 : Evaluation et validation de la protéine recombinante chimérique dans un test VIDAS® (bioMérieux)**

Cette validation est réalisée en test VIDAS® par l'utilisation d'une solution de protéine chimérique recombinante obtenue selon les exemples 1 et 2 et ayant subi le traitement dénaturant décrit dans l'exemple 2.

Le principe du test VIDAS® est le suivant: un cône constitue le support solide qui sert
20 également de système de pipetage pour les réactifs présents dans la barrette. La protéine recombinante est fixée sur le cône. Après une étape de dilution, l'échantillon est aspiré et refoulé plusieurs fois à l'intérieur du cône. Ceci permet aux IgG anti-VIH de l'échantillon de se lier à la protéine recombinante. Les composants non liés sont éliminés par lavage. Un anticorps anti-IgG humaines conjugué à la phosphatase alcaline
25 (PAL) est alors incubé dans le cône où il se fixe aux IgG anti-VIH. Des étapes de lavage éliminent le conjugué non fixé.

Pendant la dernière étape de révélation, le substrat de la PAL, le 4-méthyl-ombelliferyl phosphate, est hydrolysé en 4-méthyl-ombelliféron dont la fluorescence émise à 450 nm est mesurée. L'intensité de la fluorescence est mesurée par le système optique du
30 Vidas® et est proportionnelle à la présence d'IgG anti-VIH présents dans l'échantillon.

Les résultats sont analysés automatiquement par le VIDAS® et exprimés en RFV (Relative Fluorescent Value).

Dans cet exemple, une solution de protéine recombinante obtenue selon les exemples 1 et 2, (1,2 µg dans un millilitre de tampon bicarbonate de sodium 50 mM, SDS 0,01%,

5 pH 9,6-9,8) est incubée avec les cônes VIDAS® 18 à 24 h à température ambiante (120 µl/cône). Les cônes sont ensuite incubés dans un tampon de passivation (330 µl/cône de tampon HIV Duo contenant 3 % de sérum de veau) pendant 18 à 24 h à température ambiante

Des solutions tests (Etablissement Français du Sang, France), de sérologie HIV connue,
10 (28 µl de sérum, de statut HIV connu, dilué dans 300 µl de tampon PBS 1 X, NaCl 8,76 g/l, tween 20 2,5 % (v/v), lait écrémé en poudre 2,5 g/l, albumine 20 g/l, et 3 % (v/v) sérum de veau, pH 6,1) sont alors mis en contact avec les cônes présentant les protéines recombinantes de l'exemple 1, pendant 13 min et 20 secondes (80 cycles de pipettage/refoulement de 10 secondes). Une étape de lavage est ensuite effectuée en
15 tampon Tris 24,23 g/l, acide maléique 23,22 g/l, tween 20 0,05% (v/v), NaOH 6 g/l, NaCl 8,77 g/l, pH 6,1. Une solution d'anticorps anti-Fc humain conjugué à la PAL (P5F2F7) et dilué au 1/5000^{ème} est incubée au contact du cône pendant 5 min (avec 30 cycles de pipettage /refoulement de 10 secondes chacun). Une dernière étape de lavage est réalisé en tampon HIV Duo, avant l'étape finale de révélation.

20 Les résultats obtenus, sont exprimés en RFV (Relative Fluorescent Value). Les valeurs RFV supérieures ou égales à 250 sont arbitrairement considérées comme provenant d'un sérum HIV séro positifs. Les valeurs inférieures sont négatives. Les résultats obtenus avec la protéine recombinante obtenue selon les exemples 1 et 2, sont tous en accord avec la sérologie HIV, préalablement déterminée par le test VIDAS HIV Duo®
25 (bioMérieux®).

L'utilisation d'une telle protéine recombinante en test VIDAS® permet bien de déterminer la sérologie HIV des échantillons.

Tableau 1 – Validation expérimentale de la protéine recombinante obtenue selon les exemples 1 et 2

Solution calibrateur / sera	Références sérum	RFV (relative fluorescent value)
Sera HIV1-M positifs	9991574	9820
	9991504	9346
	9991544	9621
	9991524	9735
	9991500	9914
Sera HIV1-O positifs	48	786
Sera HIV 2 positifs	7312A	9174
	JS8-1002 0008	8475
	JS8-1002 0009	9532
	JS8-1002 0010	9472
	JS8-1002 0013	9526
	JS8-1002 0014	9695
	JS8-1002 0016	9872
	JS8-1002 0017	9090
	JS8-1002 0018	9241
	JS8-1002 0020	9391
Sera HIV séronégatifs	203	139
	222	171
	262	105
	263	84
	280	182
	285	86
	287	127
	291	173
	g10653	193
	g12290	122
	g13461	170
	g13818	192
	g13830	106
	p03512	176

Exemple 4 : Construction d'une protéine recombinante biotinylée

Une séquence consensus de biotinylation *in vivo* dans *E.coli* telle que décrite par Schatz, (Bio/technology, vol. 11, 1993) peut être fusionnée à la SEQ ID n°2

~~L'addition de la séquence SEQ ID N°23 : 5' CTG CAC CAT ATC CTG GAA GCC~~

5 **CAG AAA ATG GAA TGG CAC CCG CAC**, codant le peptide de séquence SEQ ID N°24 : LHHILEAQKM EWHPH, permet la biotinylation de la protéine recombinante obtenue selon les exemples 1 et 2 afin d'utiliser une protéine avidine conjuguée à une enzyme pour la phase de révélation dans un test EIA.

10 Les conditions d'expression et purification décrites dans l'exemples 2 restent valides avec quelques modifications. Les bactéries transformées avec le plasmide recombinant peuvent être de type BL21 ou AVB101 (Avidity, LLC). Le milieu de culture utilisé pour l'expression peut être de type : 2x YT (tryptone 16 g/l ; yeast extract 10 g/l ; NaCl 5 g/l, pH 7,0) contenant 100 µg/ml ampicilline et supplémenté par 12 µg par ml de biotine.

15

Exemple 5 : Evaluation et validation de la protéine recombinante chimérique biotinylée *in vivo* dans un test VIDAS® de type sandwich.

Cette validation est selon un protocole VIDAS® décrit dans l'exemple 3 et modifié comme suit : la protéine chimérique recombinante obtenue selon l'exemple 1 est fixée
20 sur la phase solide (cône VIDAS®) comme décrit dans l'exemple 3. Après incubation de l'échantillon dilué avec le cône puis lavage, les Ig G anti HIV liées aux cônes sont incubées avec la protéine chimérique recombinante obtenue selon l'exemple 4. Après lavage, les protéines recombinantes biotinylées fixées sur le cône réagissent avec un solution de streptavidine conjugué à la PAL. L'étape finale de révélation est conforme à
25 la description de l'exemple 3.

Les résultats sont présentés dans le tableau 2. Les valeurs RFV supérieures ou égales à 250 sont arbitrairement considérées comme positives. L'utilisation d'une telle protéine recombinante en test VIDAS® permet bien de déterminer la sérologie HIV des échantillons.

Tableau 2 – Validation expérimentale de la protéine recombinante obtenue selon les exemples 4 et 5

Solution calibrateur / sera	Références sérum	RFV
Séra HIV négatifs	CTS 8	195
	g06976	214
	g31377	170
Séra HIV 1 M positifs	9991574	4708
	9991504	1395
Séra HIV 2 positif	JS8-1002 0008	2562
	JS8-1002 0009	3754

- 5 **Exemple 6 : Amélioration de la sensibilité de la protéine recombinante chimérique**
 Afin d'augmenter encore la sensibilité de reconnaissance des anticorps anti-HIV de la protéine recombinante obtenue selon l'invention de nouveaux épitopes caractéristiques de certains sous-types HIV peuvent être ajoutés ou un des épitopes décrit peut être dupliqué dans la séquence de la protéine chimérique.

10

Exemple 7 : Addition d'une séquence hexalysine à la protéine recombinante pour faciliter le couplage d'une enzyme ou de biotine, notamment sur la fonction β -aminé de la lysine.

- Une séquence codant pour six lysines peut être fusionnée en 3' de la SEQ ID n°2.
 15 L'addition de la séquence ADN SEQ ID n°25: AAG AAA AAG AAA AAG AAA, codant pour le peptide de séquence SEQ ID n°26 : KKKKKK, permet le couplage orienté d'enzyme ou biotine en C-terminal de la protéine chimérique. Le couplage de cette protéine recombinante à la phosphatase alcaline en particulier permet l'utilisation de la protéine couplée dans un format sandwich de révélation des anticorps anti-HIV.

REVENDICATIONS

1. ADN recombinant codant une protéine recombinante chimérique comprenant

- au moins deux premiers fragments nucléotidiques codant chacun une région épitopique d'au moins un microorganisme,
- au moins un deuxième fragment nucléotidique codant une région de liaison, et
- au moins un troisième fragment nucléotidique codant une région de fixation.

2. ADN recombinant, selon la revendication 1, caractérisé en ce que ledit deuxième fragment nucléotidique comprend au moins un site de coupure.

3. ADN recombinant, selon la revendication 2, caractérisé en ce que chaque fragment nucléotidique comprend au moins un troisième fragment nucléotidique codant une région de fixation.

4. ADN recombinant codant une protéine recombinante chimérique comprenant

- au moins deux premiers fragments nucléotidiques codant chacun une région épitopique d'au moins un microorganisme,
- au moins un deuxième fragment nucléotidique codant une région de liaison, ledit deuxième fragment nucléotidique comprenant en outre au moins un site de coupure.

5. ADN recombinant selon l'une quelconque des revendications 1 à 4 caractérisé en ce que ledit deuxième fragment nucléotidique a pour séquence au moins l'une quelconque des séquences suivantes, prises seules ou en combinaison, SEQ ID N°11 SEQ ID N°13, SEQ ID N°15, SEQ ID N°17, SEQ ID N°19, ou SEQ ID N°20.

6. ADN, selon l'une quelconque des revendications 1 à 5, caractérisé en ce que ledit microorganisme est un virus, préférentiellement le virus HIV-1 ou le virus HIV-2.
- 5 7. ADN, selon la revendication 6, caractérisé en ce que le virus HIV-1 est de groupe M ou de groupe O
8. ADN, selon l'une quelconque des revendications 1 à 7 caractérisé en ce que les premiers fragments nucléotidiques codent au moins deux régions immunodominantes comprises parmi tout ou partie de la glycoprotéine gp 120 d'HIV-1, de la glycoprotéine gp 41 d'HIV-1 de groupe M, de la glycoprotéine gp 41 d'HIV-1 de groupe O ou de la glycoprotéine gp 36 d'HIV-2.
- 10
9. ADN, selon la revendication 8, caractérisé en ce que chaque premier fragment nucléotidique a pour séquence l'une quelconque des séquences SEQ ID N°3, SEQ ID N°5, SEQ ID N°7 ou SEQ ID N°9.
- 15
10. ADN, selon l'une quelconque des revendications 1 à 9, caractérisé en ce que ledit troisième fragment nucléotidique a pour séquence l'une quelconque des séquences SEQ ID N°21, SEQ ID N° 23 ou SEQ ID N°25.
- 20
11. Protéine recombinante chimérique codée par un ADN recombinant, selon l'une quelconque des revendications 1 à 10, comprenant
- au moins deux régions épitopiques d'au moins un microorganisme,
 - au moins une région de liaison, et
 - au moins une région de fixation.
- 25
12. Protéine, selon la revendication 11, caractérisée en ce que ladite région de liaison est un peptide comprenant au moins une glycine et/ou au moins une sérine.
- 30

13. Protéine, selon la revendication 12, caractérisée en ce que ladite région de liaison a pour séquence l'une quelconque des séquences SEQ ID N° 12, SEQ ID N°14, SEQ ID N°16 ou SEQ ID N°18.

5 14. Protéine, selon la revendication 11 à 13, caractérisée en ce que ladite région de fixation est un peptide situé à l'une quelconque des extrémités N ou C-terminales de ladite protéine recombinante chimérique.

10 15. Protéine, selon la revendication 11 à 14, caractérisée en ce que ladite région de fixation est une région riche en histidines et ses dérivés, tel qu'une région contenant une densité d'histidines, supérieure ou égale à 25%, et préférentiellement supérieure ou égale à 33%.

15 16. Protéine selon la revendication 15 caractérisée en ce que la région de fixation comporte au moins quatre histidines et préférentiellement six histidines adjacentes.

20 17. Protéine selon la revendication 11 à 16 caractérisée en ce que ladite région de fixation est un peptide comprenant au moins une lysine.

18. Protéine selon la revendication 17 caractérisée en ce que ladite région de fixation a pour séquence SEQ ID N°22, 24 ou 26.

25 19. Vecteur d'expression comprenant un ADN recombinant selon l'une quelconque des revendications 1 à 10.

30 20. Utilisation d'au moins un ADN selon l'une quelconque des revendications 1 ou 10 et/ou d'au moins une protéine recombinante chimérique selon l'une quelconque des revendications 11 à 18 pour le diagnostic in vitro.

SEQUENCE LISTING

<110> BIOMERIEUX SA

<120> Protéine recombinante chimérique et diagnostic in vitro

<130> Unknown

<160> 26

<170> PatentIn version 3.1

<210> 1

<211> 423

<212> DNA

<213> Artificial

<400> 1

atgaggggat ccagaatcct agctgtggaa agatacctaa aggatcaaca gctcctag
gg 60

atttgggggtt gctctggaaa actcatttgc accactgctg tgagctccgg ttcaggcg
ct 120

atagagaagt acctacagga ccaggcgccg ctaaattcat ggggatgtgc gtttagac
aa 180

gtctgctcga gcggttcttg aggaggagat atgagggaca attggagaag tgaattat
at 240

aatataaag tagtaaaaat tgaaccatta ggagtagcac ccaccaagtc tgcaggcc
gt 300

ctgcttgctc tggaaccct gcttcagaac caacagctgc tttctctgtg gggttgca
aa 360

ggtaagctgg tttgctacac ctctgttaaa gcttcccacc atcaccatca ccattgat
ct 420

aga
423

<210> 2

<211> 138

<212> PRT

<213> Artificial

<400> 2

Met Arg Gly Ser Arg Ile Leu Ala Val Glu Arg Tyr Leu Lys Asp Gln

1

5

10

15

Gln Leu Leu Gly Ile Trp Gly Cys Ser Gly Lys Leu Ile Cys Thr Thr

20

25

30

Ala Val Ser Ser Gly Ser Gly Ala Ile Glu Lys Tyr Leu Gln Asp Gln

35

40

45

Ala Arg Leu Asn Ser Trp Gly Cys Ala Phe Arg Gln Val Cys Ser Ser

50

55

60

Gly Ser Gly Gly Gly Asp Met Arg Asp Asn Trp Arg Ser Glu Leu Tyr

65

70

75

80

Lys Tyr Lys Val Val Lys Ile Glu Pro Leu Gly Val Ala Pro Thr Lys

85

90

95

Ser Ala Gly Arg Leu Leu Ala Leu Glu Thr Leu Leu Gln Asn Gln Gln

100

105

110

Leu Leu Ser Leu Trp Gly Cys Lys Gly Lys Leu Val Cys Tyr Thr Ser

115

120

125

Val Lys Ala Ser His His His His His His

130

135

<210> 3

<211> 90

<212> DNA

<213> HIV 1

<400> 3

agaatcctag ctgtggaaag atacctaaag gatcaacagc tcctagggat ttgggggtt
gc 60

tctggaaaac tcatttgcac cactgctgtg
90

<210> 4

<211> 30

<212> PRT

<213> HIV 1

<400> 4

Arg Ile Leu Ala Val Glu Arg Tyr Leu Lys Asp Gln Gln Leu Leu Gly

1

5

10

15

Ile Trp Gly Cys Ser Gly Lys Leu Ile Cys Thr Thr Ala Val
20 25 30

<210> 5

<211> 90

<212> DNA

<213> HIV 1

<400> 5

cgtctgcttg ctctggaaac cctgcttcag aaccaacagc tgctttctct gtgggggtt
gc 60

aaaggtaagc tggtttgcta cacctctggt
90

<210> 6

<211> 30

<212> PRT

<213> HIV 1

<400> 6

Arg Leu Leu Ala Leu Glu Thr Leu Leu Gln Asn Gln Gln Leu Leu Ser

1

5

10

15

Leu Trp Gly Cys Lys Gly Lys Leu Val Cys Tyr Thr Ser Val
20 25 30

<210> 7

<211> 69

<212> DNA

<213> HIV 2

<400> 7

gctatagaga agtacctaca ggaccaggcg cggctaaatt catgggggatg tgcgttta
ga 60

caagtctgc
69

<210> 8

<211> 23

<212> PRT

<213> HIV 2

<400> 8

Ala Ile Glu Lys Tyr Leu Gln Asp Gln Ala Arg Leu Asn Ser Trp Gly

1

10

15

Cys Ala Phe Arg Gln Val Cys
20

<210> 9
<211> 90
<212> DNA
<213> HIV 1

<400> 9
ggaggaggag atatgaggga caattggaga agtgaattat ataaatataa agtagtaa
aa 60

attgaaccat taggagtagc accaccaag
90

<210> 10
<211> 30
<212> PRT
<213> HIV 1

<400> 10

Gly Gly Gly Asp Met Arg Asp Asn Trp Arg Ser Glu Leu Tyr Lys Tyr

1 5 10 15

Lys Val Val Lys Ile Glu Pro Leu Gly Val Ala Pro Thr Lys
20 25 30

<210> 11
<211> 16
<212> DNA
<213> Artificial

<400> 11
gagctccggt tcaggc
16

<210> 12
<211> 5
<212> PRT
<213> Artificial

<400> 12

Ser Ser Gly Ser Gly
1 5

<210> 13
<211> 13
<212> DNA
<213> Artificial

<400> 13
ctcgagcggg tct
13

<210> 14
<211> 4
<212> PRT
<213> Artificial

<400> 14

Ser Ser Gly Ser
1

<210> 15
<211> 9
<212> DNA
<213> Artificial

<400> 15
tctgcaggc
9

<210> 16
<211> 3

<212> PRT
<213> Artificial

<400> 16

Ser Ala Gly
1

<210> 17
<211> 9
<212> DNA
<213> Artificial

<400> 17
aaagcttcc
9

<210> 18
<211> 3
<212> PRT
<213> Artificial

<400> 18

Lys Ala Ser
1

<210> 19
<211> 12
<212> DNA
<213> Artificial

<400> 19
atgaggggat cc
12

<210> 20
<211> 17
<212> DNA
<213> Artificial

<400> 20

artcaatgag gggatcc
17

<210> 21
<211> 18
<212> DNA
~~<213> Artificial~~

<400> 21
caccatcacc atcaccat
18

<210> 22
<211> 6
<212> PRT
<213> Artificial

<400> 22

His His His His His His
1 5

<210> 23
<211> 45
<212> DNA
<213> Artificial

<400> 23
ctgcaccata tcctggaagc ccagaaaatg gaatggcacc cgcac
45

<210> 24
<211> 15
<212> PRT
<213> Artificial

<400> 24

Leu His His Ile Leu Glu Ala Gln Lys Met Glu Trp His Pro His
1 5 10 15

<210> 25
<211> 18
<212> DNA
<213> Artificial

<400> 25
aagaaaaaga aaaagaaa
18

<210> 26
<211> 6
<212> PRT
<213> Artificial

<400> 26

Lys Lys Lys Lys Lys Lys
1 5



BREVET D'INVENTION

CERTIFICAT D'UTILITÉ

Code de la propriété intellectuelle - Livre VI

N° 11235*03

DÉPARTEMENT DES BREVETS

26 bis, rue de Saint Pétersbourg
75800 Paris Cedex 08

Téléphone : 33 (1) 53 04 53 04 Télécopie : 33 (1) 42 94 86 54

DÉSIGNATION D'INVENTEUR(S) Page N° 1.../1...

(À fournir dans le cas où les demandeurs et les inventeurs ne sont pas les mêmes personnes)



Cet imprimé est à remplir lisiblement à l'encre noire

DS 113 @ W / 270601

Vos références pour ce dossier (facultatif)		POLYTOP
N° D'ENREGISTREMENT NATIONAL		02.11.685
TITRE DE L'INVENTION (200 caractères ou espaces maximum)		
Protéine recombinante chimérique et diagnostic in vitro		
LE(S) DEMANDEUR(S) :		
bioMérieux SA		
DESIGNE(NT) EN TANT QU'INVENTEUR(S) :		
<input checked="" type="checkbox"/>	Nom	LETOURNEUR
	Prénoms	Odile
<input type="checkbox"/>	Adresse	Rue
		6, allée Buffon
		Code postal et ville
		16 19 1 1 0 Sainte Foy les Lyon
	Société d'appartenance (facultatif)	
<input checked="" type="checkbox"/>	Nom	
	Prénoms	
<input type="checkbox"/>	Adresse	Rue
		Code postal et ville
	Société d'appartenance (facultatif)	
<input checked="" type="checkbox"/>	Nom	
	Prénoms	
<input type="checkbox"/>	Adresse	Rue
		Code postal et ville
	Société d'appartenance (facultatif)	
S'il y a plus de trois inventeurs, utilisez plusieurs formulaires. Indiquez en haut à droite le N° de la page suivi du nombre de pages.		
DATE ET SIGNATURE(S)		
DU (DES) DEMANDEUR(S)		
OU DU MANDATAIRE		
(Nom et qualité du signataire)		
16/09/02		
Ingenieur brevet		

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ **BLACK BORDERS**
- ☐ **IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**
- ☐ **FADED TEXT OR DRAWING**
- ☐ **BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**
- ☐ **SKEWED/SLANTED IMAGES**
- ☐ **COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**
- ☐ **GRAY SCALE DOCUMENTS**
- ☒ **LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**
- ☐ **REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**
- ☐ **OTHER:** _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.